

ANÁLISE BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DO GENE BAX INIBIDOR 1 ISOLADO DA INTERAÇÃO ENTRE *Theobroma cacao* E *Crinipellis perniciosa*

Daniele De Souza França¹; Fabienne Micheli²; Cristina Pungartnik³; Júlio César de
Mattos Cascardo⁴; Abelmon Da Silva Gesteira⁵.

¹Discente do Curso de Biologia do DCB/UESC, Bolsista Programa FAPESB/UESC, E-mail: danifranca3@ibest.com.br; ²Professora Vistante DCB/UESC/CIRAD; ³Professor Adjunto DCB/UESC; ⁴Professor Adjunto DCB/UESC; ⁵Professor Adjunto Visitante DCB/UESC.

INTRODUÇÃO

A cultura do cacau (*Theobroma cacao*) foi um dos mais importantes fatores do desenvolvimento econômico do estado da Bahia. Entretanto, nos últimos anos, encontra-se numa posição delicada, motivada pelas grandes oscilações do preço do cacau nos mercados internacionais, aliado a uma alta incidência de doenças, dentre elas, a vassoura de bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* (stahel) Singer. Os genes reguladores de morte celular estão relacionados à defesa da planta contra patógenos. A proteína Bax inibidor 1 (BI-1) desempenha função importante na supressão da morte celular programada (PCD) induzida pelo gene proapoptótico Bax (Watanabe et al., 2004) ou por estresses, na presença do H₂O₂, ou ainda, pelo ácido salicílico (Kawai-Yamada et al., 2004). O objetivo do presente trabalho é de caracterizar a expressão temporal e espacial do gene Bax inibidor 1 de *T. cacao* (TcBI-1) ao longo das fases da doença vassoura de bruxa em clones de Catongo e TSH1188, bem como analisar a ação do gene como regulador de morte celular em levedura.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculou-se de forma artificial uma suspensão de 75.000 basidiósporos/ml de *Crinipellis perniciosa* nos acessos de *T. cacao*, TSH 1188 e Catongo. Visando o estudo das diversas fases da doença, meristemas foram coletados após 24, 48 e 72 horas, de inoculação, além de 30 e 60 dias. O RNA total dos meristemas foi extraído conforme protocolo (Gesteira et al., 2003), em condições RNase free. Os RNAs obtidos foram tratados com DNase, purificados através do Kit da Sinapse (Morligem Bioscience) e usados para sintetizar o cDNA. A abundância relativa dos transcritos do gene TcBI-1 em diferentes amostras referente às fases da doença foi avaliada utilizando os primers específicos TcBI F GAATTCATATGGACGCGTTCTCTTCG 3' e TcBI R 5' GCTAGCAAGCTTAGTCACTCCGTCTCTTC 3'. Após a reação de PCR, aplicou-se a amostra em gel de agarose a 1%. A imagem do gel foi fotodocumentada empregando-se uma câmera Kodac Microvision CCD de alta resolução (1024 x 1024 pixel).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se RNA de boa qualidade a partir de meristemas de plantas inoculadas com o fungo *Crinipellis perniciosa* do acesso TSH 1188. Com base nas análises de RT-PCR observou-se que os níveis transcritos do gene TcBI-1 apresentavam-se mais elevados no acesso resistente TSH 1188 quando comparado ao acesso susceptível Catongo, principalmente nos pontos um mês e dois meses após inoculação. Propõem-se que a proteína TcBI-1 deverá atuar inibindo a morte celular programada induzidas por moléculas do fungo que resultam em um estresse oxidativo, caracterizando, desta forma a função do gene Bax inibidor 1 na relação *Theobroma cacao*-*Crinipellis perniciosa*.

CONCLUSÃO

Os esforços até hoje realizados para deter o avanço da vassoura de bruxa na região



cacaueira foram eficazes mas não definitivos. Os resultados da presente pesquisa evidenciaram o envolvimento do gene TcBI 1 na supressão de morte celular causada pelo gene proapoptótico Bax relacionado com a vassoura de bruxa e sua maior expressão em clones de TSH 1188 em comparação ao Catongo quando inoculadas com o agente etiológico da doença. A perspectiva é clonar o gene completo do Bax inibidor 1, utilizando uma clonagem intermediária no vetor PTZ R/T para análises de Western Blot bem como a morte celular programada em levedura quando submetida as condições de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GESTEIRA, A. S., MICHELI, F. F. L., FERREIRA, C. F., CASCARDO, J. C.. M. (2003) Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cocoa tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicios*. *Biotechniques*. 35.494 – 500

KAWAI-YAMADA, M., OHORI, Y. and UCHIMIYA, H. (2004) Dissection of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 Suppressing Bax-,Hydrogen Peroxide-, and Salicylic Acid-Induced Cell Death. *The Plant Cell*. 16, 21-32.

WATANABE, N. and LAM, E. (2004) Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor in plants:their possible roles as regulator of programmed cell death. *M. Plant Pathol*. 5, 65-70.

WHEELER , B . E . J . , Ter growth of *Crinipellis pernicios* in living and dead cocoa tissue . In : Moore , D . ; Casselton , L : A . ; Wood , D . A , Frankland , J . C , ed . *Development biology of higher fungi* . Cambridge : Cambridge University , 1985 p. 103-116.

PALAVRAS-CHAVE: *Theobroma cacao*;morte celular;Bax inibidor 1

AGÊNCIAS FINANCIADORAS: International Foundation for Science.